

Verfahren zur Unterscheidung von 5-Position Methylierungsänderungen von Cytosin-Basen und Cytosin-zu-Thymin Mutationen und zum Nachweis von single nucleotide polymorphisms (SNPs) oder Punktmutation in genomischer DNA

Publication number: DE19951189

Publication date: 2001-05-03

Inventor: BERLIN KURT (DE)

Applicant: EPIGENOMICS AG (DE)

Classification:

- international: G01N27/62; C12N15/09; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N21/78; G01N27/447; G01N33/483; G01N33/53; G01N33/566; G01N33/58; G01N27/62; C12N15/09; C12Q1/48; C12Q1/68; G01N21/77; G01N27/447; G01N33/483; G01N33/53; G01N33/566; G01N33/58; (IPC1-7): C12Q1/68

- European: C12Q1/68B6

Application number: DE19991051189 19991015

Priority number(s): DE19991051189 19991015

Also published as:



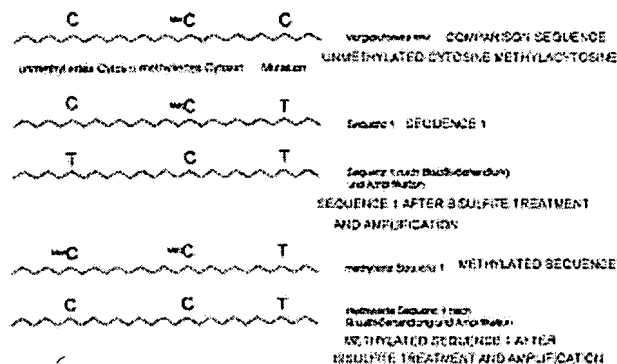
WO0127317 (A3)
WO0127317 (A2)
EP1228246 (A3)
EP1228246 (A2)
US7179594 (B1)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract of DE19951189

The invention relates to a method for distinguishing 5-position methylation changes of cytosine bases and cytosine-to-thymine mutations and for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs) or point mutations in genomic DNA, comprising the following steps: a) treating a genomic DNA-sample with sulphite or disulphite in such a way that all of the cytosine bases not methylated in the 5-position of the base are changed in such a way as to produce a different base according to the base pairing behaviour while the cytosines which are methylated in the 5-position remain unchanged; b) quantitatively methylating an aliquot of the same genomic DNA sample before chemical treatment according to a) with Sss1 or another methyltransferase; c) testing the two DNA samples treated in this way for the presence of cytosine using the same analytical methods; and d) comparing the cytosine positions that are detected with a reference DNA-sequence.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 51 189 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68

②① Aktenzeichen: 199 51 189.6
②② Anmeldetag: 15. 10. 1999
④③ Offenlegungstag: 3. 5. 2001

DE 199 51 189 A 1

⑦① Anmelder:
Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
10119 Berlin

⑦② Erfinder:
Berlin, Kurt, Dr., 14532 Stahnsdorf, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
DE 197 54 482 A1
Datenbank CAPLUS bei STN, AN 1996:85184
CAPLUS zu:
Novel nonsense mutation in the hypoxanthine
guanine phosphoribosyltransferase gene and
nonradom X-inactivation causing Lesch-Nyhan
syndrome in a female patient. Aral, B. et al.,
Hum. Mutat. (1996), 7(1), 52-8;
Datenbank CAPLUS bei STN, AN 1998:734783
CAPLUS
zu: Methylation levels at selected CpG sites in
the factor VIII and FGFR3 genes, in mature female
and male germ cells: implications for male-driven
evolution. El-Maarri, O. et al., Am. J.Hum. Genet.
(1998), 63(4), 1001-1008;
Datenbank CAPLUS bei STN, AN 1997:40537
CAPLUS zu:
A modified and improved method for bisulfide
based
cytosine methylation analysis. Olek, A. et al.,
Nucleic Acids Res. (1996) 24(24), 5064-5066;

Datenbank MEDLINE bei STN, AN 96413032
MEDLINE zu:
Cytosine methylation quantitation by automated
genomic sequencing and GENESCAN analysis.
Paul,
C.L. & Clark, S.J., Biotechniques, (1996 Jul)
21 (1) 126-33.;
Datenbank BIOSIS bei STN, AN 1997:339673
BIOSIS
zu COBRA: A sensitive and quantitative DNA
methylation assay. Xiong, Z. & Laird, P.W., Nucleic
Acids Research, (1997) Vol. 25, No.12, pp. 2532-
2534.;
Datenbank BIOSIS bei STN, AN 1994:451668
BIOSIS
zu: Global DNA hypomethylation increases
progressively in cervical dysplasia and carcinoma.
Kim, Y.-I. et al., Cancer (Philadelphia), (1994)
Vol. 74, No. 3, pp. 893-899.;
Datenbank BIOSIS bei STN, AN 1996:526740
BIOSIS
zu: Global DNA hypomethylation occurs in the early
stages of intestinal type gastric carcinoma. Cravo
M. et al., Gut, (1996) Vol. 39, No. 3, pp. 434-438;
Datenbank BIOSIS bei STN, AN 1997:16178 BIOSIS
zu:
DNA hypomethylation and proliferative activity are
increased in the rectal mucosa of patients with
long-standing ulcerative colitis. Gloria, L. et al.;
Cancer, (1996) Vol. 78, No.11, pp.2300-2306.;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

DE 199 51 189 A 1 ⑤④ Verfahren zur Unterscheidung von 5-Position Methylierungsänderungen von Cytosin-Basen und Cytosin-zu-Thymin Mutationen und zum Nachweis von single nucleotide polymorphisms (SNPs) oder Punktmutation in genomischer DNA

⑤⑦ Beschrieben ist ein Verfahren zur Unterscheidung von 5-Position Methylierungsänderungen von Cytosin-Basen und Cytosin-zu-Thymin Mutationen und zum Nachweis von single nucleotide polymorphisms (SNPs) oder Punktmutationen in genomischer DNA, wobei man
a) eine genomische DNA-Probe mit Sulfid oder Disulfid derart behandelt, daß alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosinbasen derart verändert werden, so daß eine dem Basenpaarungsverhalten nach unterschiedliche Base entsteht, während die an der 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben und
b) ein Aliquot derselben genomischen DNA-Probe vor der chemischen Behandlung nach a) mit SSS1 oder einer an-

deren Methyltransferase quantitativ aufmethyliert und
c) die beiden so behandelten DNA-Proben mittels der gleichen analytischen Methode auf die Präsenz von Cytosin untersucht und
d) die ermittelten Cytosin Positionen mit einer Referenz DNA-Sequenz abgeglichen werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Unterscheidung von 5-Position Methylierungsänderungen von Cytosin-Basen und Cytosin-zu-Thymin Mutationen und zum Nachweis von single nucleotide polymorphisms (SNPs) oder Punktmutationen in genomischer DNA.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern ist die Annahme naheliegend, daß pathogene Zustände sich in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms äußern.

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Detektion des Methylierungszustandes genomischer DNA Proben, wobei insbesondere Mutationen und Cytosin Methylierungen voneinander unterschieden werden können. Das Verfahren kann auch zum Auffinden von Punktmutationen und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) genutzt werden.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, genomischem Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Die Modifikation der genomischen Base Cytosin zu 5'-Methylcytosin stellt den bis heute wichtigsten und bestuntersuchten epigenetischen Parameter dar. Trotzdem gibt es bis heute zwar Methoden, umfassende Genotypen von Zellen und Individuen zu ermitteln, aber noch keine vergleichbaren Ansätze auch in großem Maße epigenotypische Information zu generieren und auszuwerten.

Es sind im Prinzip drei prinzipiell verschiedene Methoden bekannt, den 5-Methyl-Status eines Cytosins im Sequenzkontext zu bestimmen.

Die erste prinzipielle Methode beruht auf der Verwendung von Restriktionsendonukleasen (RE), welche "methylierungssensitiv" sind. REs zeichnen sich dadurch aus, daß sie an einer bestimmten DNA-Sequenz, meist zwischen 4 und 8 Basen lang, einen Schnitt in die DNA einführen. Die Position solcher Schnitte kann dann durch Gelelektrophorese, Transfer auf eine Membran und Hybridisierung nachgewiesen werden. Methylierungssensitiv bedeutet, daß bestimmte Basen innerhalb der Erkennungssequenz unmethyliert vorliegen müssen, damit der Schnitt erfolgen kann. Das Bandenmuster nach einem Restriktionsschnitt und Gelelektrophorese ändert sich also je nach Methylierungsmuster der DNA. Allerdings befinden sich die wenigsten methylierbaren CpG innerhalb von Erkennungssequenzen von REs, können also nach dieser Methode nicht untersucht werden.

Die Empfindlichkeit dieser Methoden ist extrem niedrig (Bird, A. P., and Southern, E. M., J. Mol. Biol. 118, 27-47). Eine Variante kombiniert PCR mit dieser Methode, eine Amplifikation durch zwei auf beiden Seiten der Erkennungssequenz liegende Primer erfolgt nach einem Schnitt

nur dann, wenn die Erkennungssequenz methyliert vorliegt. Die Empfindlichkeit steigt in diesem Fall auf theoretisch ein einziges Molekül der Zielsequenz, allerdings können mit hohem Aufwand nur einzelne Positionen untersucht werden (Shemer, R. et al., PNAS 93, 6371-6376). Wiederum ist Voraussetzung, daß sich die methylierbare Position innerhalb der Erkennungssequenz einer RE befindet.

Die zweite Variante beruht auf partieller chemischer Spaltung von Gesamt-DNA, nach dem Vorbild einer Maxam-Gilbert Sequenzierungsreaktion, Ligation von Adaptoren an die so generierten Enden, Amplifikation mit generischen Primern und Auftrennung auf einer Gelelektrophorese. Mit diesem Verfahren können definierte Bereiche bis zur Größe von weniger als tausend Basenpaaren untersucht werden. Das Verfahren ist allerdings so kompliziert und unzuverlässig, daß es praktisch nicht mehr verwendet wird (Ward, C. et al., J. Biol. Chem. 265, 3030-3033).

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulphit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basen-Paarungsverhalten dem Thymin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, daß Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch "normale" molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt werden kann. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulphit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausende von möglichen Methylierungsereignissen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannte Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann auch dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 26, 2255 (1998).

Die Bisulphit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zeschnick, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 5, 94-98; Kubota T. et al., Nat. Genet. 16, 16-17) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulphit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. and Walter, J., Nat. Genet. 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine "Primer-Extension-Reaktion" (Gonzalzo, M. L. and Jones, P. A., Nucl. Acids. Res. 25, 2529-2531) oder Enzymschnitt (Xiong, Z. and Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO99 28498).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen

Genen befaßt, sind: Xiong, Z. and Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalgo, M. L. and Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. and Clark, S. (1994), Bioessays 16, 431; Zeschner, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO 97/46705, WO 95/15373 und WO 97/45560.

Gemeinsamkeiten zwischen Promotoren bestehen nicht nur im Vorkommen von TATA- oder GC-Boxen sondern auch darin, für welche Transkriptionsfaktoren sie Bindestellen besitzen und in welchem Abstand diese sich zueinander befinden. Die existierenden Bindestellen für ein bestimmtes Protein stimmen in ihrer Sequenz nicht vollständig überein, es finden sich aber konservierte Folgen von mindestens 4 Basen, die durch das Einfügen von "Wobbles", d. h. Positionen, an denen sich jeweils unterschiedliche Basen befinden, noch verlängert werden können. Des weiteren liegen diese Bindestellen in bestimmten Abständen zueinander vor.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich auch einer im Januar 1999 erschienen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der dort zitierten Literatur entnehmen.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) ist eine neue, sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. and Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analytmolekül wird in eine im UV absorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix ins Vakuum verdampft und das Analyt so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feld-freies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere und die Flugzeit wird in die Masse der Ionen umgerechnet.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet sind für die Fluoreszenzmarkierung ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Methylasen, die Cytosinbasen in bestimmten Sequenzkontexten methylieren, sind bekannt und zum Teil auch kommerziell erhältlich. SssI Methylase beispielsweise methyliert Cytosin im Sequenzkontext CpG (siehe z. B. Renbaum, P. et al. (1990), Nucleic Acids Res. 18, 1145) und ist z. B. Bei New England Biolabs erhältlich, ebenso wie andere Methylasen wie AluI, BamHI oder HaeIII.

Ausschließlich durch Bisulfit-Behandlung, Amplifikation und nachfolgendes Sequenzieren oder Hybridisieren, wie es Stand der Technik ist, lassen sich methylierte Cytosinpositionen nicht mit Sicherheit nachweisen. Wird an der betreffenden Position ein Thymin statt eines Cytosins nachgewiesen, so kann es sich um eine Mutation gegenüber der herangezogenen Vergleichssequenz, aber auch um ein in der genomischen Proben-DNA nicht methyliertes Cytosin handeln, das durch die Bisulfitbehandlung zuerst in Uracil und bei der Amplifikation schließlich in Thymin im Sequenzkontext umgewandelt wurde, handeln. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher dieses Problem zu lösen.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur Unterscheidung von 5-Position Methylierungsänderungen von Cytosin-Basen und Cytosin-zu-Thymin Mutationen und zum Nachweis von single nucleotide polymorphisms

(SNPs) oder Punktmutationen in genomischer DNA geschaffen wird, bei dem man

- a) eine genomische DNA-Probe mit Sulfit oder Disulfit oder einer anderen Chemikalie derart behandelt, daß alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosinbasen derart verändert werden, so daß eine dem Basenpaarungsverhalten nach unterschiedliche Base entsteht, während die an der 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben und
- b) ein Aliquot der selben genomischen DNA-Probe vor der chemischen Behandlung nach a) mit SSS1 oder einer anderen Methyltransferase quantitativ aufmethyliert und
- c) die beiden so behandelten DNA-Proben mittels der gleichen analytischen Methode auf die Präsenz von Cytosin untersucht und
- d) die ermittelten Cytosin Positionen mit einer Referenz DNA-Sequenz abgeglichen werden.

Die vorliegende Erfindung löst die Aufgabe also dadurch, daß ein aufmethyliertes Aliquot derselben Probe gleichermaßen behandelt wird und die erhaltenen Sequenzinformationen mit der Sequenz einer Referenz-DNA abgeglichen werden, wobei eine Unterscheidung zwischen Mutationen und Cytosin Methylierung möglich wird. Zudem ist es auch möglich, im Rahmen dieses Verfahrens neue Mutationen und Polymorphismen, insbesondere C-T Mutationen, aufzufinden.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Verfahren, wobei man über den Vergleich der einzelnen Cytosin-Positionen aus den beiden unterschiedlich behandelten Proben mit der Referenz-Sequenz ermittelt, ob an einer bestimmten Position Cytosin nicht nachweisbar ist und ob dies darauf beruht, daß das Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorliegt oder durch eine Mutation oder einen Polymorphismus verändert vorliegt und somit in der genomischen DNA nicht vorhanden ist.

Erfindungsgemäß ist ferner ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die beiden DNA-Proben oder Teile dieser DNA-Proben vor dem Nachweis der Base Cytosin mit einem cyclischen Prozess, nämlich der Polymerase Kettenreaktion oder einem vergleichbaren Prozess amplifiziert.

Bevorzugt ist dabei, daß man in einem Amplifikations-Ansatz mehr als 10 verschiedene Fragmente der behandelten genomischen DNAs erzeugt.

Bevorzugt ist es ferner, daß man zur Amplifikation der genomischen DNA-Proben solche Primer verwendet, welche für die Genregulation wichtige sogenannte Konsensus-Sequenzen oder solche Sequenzen enthalten und die damit überwiegend an regulative oder kodierende Sequenzen binden.

Besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, daß man Cytosin im spezifischen Kontext 5'-CpG-3' detektiert.

Weiterhin ist es bevorzugt, daß man die DNA bei der Amplifikation durch Einbau von mit einer detektierbaren Markierung versehenen Nukleotidbausteinen oder Oligonukleotiden insgesamt mit einer oder mehreren detektierbaren Markierung(en) versieht.

Insbesondere bevorzugt ist es, daß die Detektion der Markierung durch Fluoreszenz oder Chemolumineszenz erfolgt.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren ist ferner bevorzugt, daß man Cytosin über Hybridisierung mit für "Sequenzkontext-Cytosin-Sequenzkontext" spezifischen Oligomeren nachweist, welche in einer definierten Anordnung auf einer oder mehreren Oberflächen fixiert sind.

Hierbei ist es bevorzugt, daß man für jedes in seinem se-

quenzspezifischen Kontext nachzuweisende Cytosin mindestens ein zu dem Sequenzkontext komplementäres Oligomer auf der Oberfläche fixiert, welches das zum nachzuweisenden Cytosin komplementäre Guanin enthält und ein weiteres Oligomer, welches an der Stelle des nachzuweisenden Cytosins die Base enthält, welche zu der Base komplementär ist, in welche nicht methylierte Cytosine durch die chemische Behandlung umgewandelt werden.

Weiterhin ist hierbei bevorzugt, daß man für nachzuweisende Cytosin-Positionen solche Oligomere fixiert, die jeweils an die methylierte und unmethylierte Position sowohl auf Plus- als auch auf Minus-Strang spezifisch binden oder/und an die je durch Amplifikation entstehenden komplementären Stränge spezifisch hybridisieren.

Hierbei ist weiterhin bevorzugt, daß man auf der Oberfläche weitere Oligomere fixiert, welche jeweils an die Sequenz "Sequenzkontext-Thymin-Sequenzkontext" spezifisch binden und/oder welche Cytosin und die durch chemische Behandlung entstandene Base im Plus-Strang, Minus-Strang und den je durch Amplifikation entstehenden komplementären Strängen entstehenden Strängen nachweisen.

Es ist erfindungsgemäß weiterhin bevorzugt, daß man von den Oligomeren an Punkten der Oberfläche(n) Signale detektiert, die für die in der originalen genomischen Probe methylierten, oder unmethylierten oder mutierten spezifisch sind.

Dabei ist insbesondere bevorzugt, daß man durch den Vergleich der detektierten Signale der absolute Grad der Methylierung und/oder die Homo- bzw. Heterozygotie ermittelt.

Erfindungsgemäß ist ferner das Verfahren, wobei man die amplifizierten Fragmente der beiden Proben auf je einer Oberfläche fixiert und mit einer nachweisbaren Markierung versehene, sequenzspezifische Oligomere auf diese Oberflächen hybridisiert.

Bevorzugt ist es, daß man die Analyse der hybridisierten sequenzspezifischen Oligomere mittels Massenspektrometrie und bevorzugt einem MALDI Massenspektrometer durchführt.

Es ist weiterhin bevorzugt, daß man die Analyse der hybridisierten sequenzspezifischen Oligomere mittels Fluoreszenz oder Chemolumineszenz durchführt.

Eine besonders bevorzugte Variante des Erfindungsgemäßen Verfahrens ist es, daß der Nachweis von Cytosin im Sequenzkontext durch eine Polymerase-Reaktion, welche spezifisch bei Erreichen einer Cytosin-Base im Templat gestoppt wird, und Längenmessung der entstehenden Fragmente erfolgt.

Hierbei ist insbesondere bevorzugt, daß man die Oligomere, die zum Starten der primer-abhängigen Polymerase-Reaktion benutzt werden, je unterschiedliche Sequenz an unterschiedlichen Orten auf einer Oberfläche fixiert und die Polymerase-Reaktion auf dieser Oberfläche erfolgt.

Dabei ist weiterhin bevorzugt, daß man die Oligomere, die zum Starten der primer-abhängigen Polymerase-Reaktion benutzt werden, durch eine chemische Reaktion oder durch Licht von der Oberfläche ablöst.

Erfindungsgemäß ist weiterhin bevorzugt, daß man zur Termination der Polymerasereaktion an der Position eines Cytosins oder – im Gegenstrang – eines Guanins einen Nukleotidbaustein verwendet, welcher über eine chemische Modifikation auch eine Detektion zum Beispiel durch Fluoreszenz, Chemolumineszenz oder das Binden eines Antikörpers erlaubt.

Außerdem ist bevorzugt, daß man die Detektion der Termination an der Position eines Cytosins oder – im Gegenstrang – eines Guanins über eine Längenmessung der entstehenden Fragmente durch Gelelektrophorese, insbesondere

Kapillarelektrophorese durchführt.

Weiterhin ist dabei bevorzugt, daß man die Längenmessung der entstehenden Fragmente durch massenspektrometrische Analyse und bevorzugt in einem MALDI Massenspektrometer durchführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ferner, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenz DNA-Sequenz aus einer Datenbank, nämlich aus dem Humangenom-Projekt, stammt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, enthaltend Referenz-DNA und/oder Chemikalien und Hilfsmittel zur Durchführung der Bisulfit-Reaktion und/oder der Amplifikation und/oder eine Methyltransferase und/oder Dokumentation zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Das beschriebene Verfahren dient zur Unterscheidung von 5-Methylcytosin-Positionen und Punktmutationen/Polymorphismen in genomischer DNA, kann jedoch auch zum Auffinden und zum Nachweis von Punktmutationen/Polymorphismen genutzt werden. **Abb. 1** faßt das Verfahren am Beispiel einer beliebigen Sequenz 1 zusammen.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die folgenden Schritte ausgeführt:

Eine genomische DNA-Probe wird derart chemisch behandelt, daß alle nicht an der 5-Position methylierten Cytosinbasen derart verändert werden, daß eine dem Basenpaarungsverhalten nach unterschiedliche Base entsteht, während die an der 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Bevorzugt wird in diesem Schritt eine Behandlung mit einer Bisulfitlösung (= Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließende alkalische Hydrolyse durchgeführt. Diese Behandlung führt zu einer Umwandlung der nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil, dessen Basenpaarungsverhalten dem Thymin entspricht, als das die betreffenden Positionen nach der Amplifikation auch vorliegen.

Im zweiten Schritt wird ein Aliquot der selben genomischen DNA-Probe vor der oben beschriebenen chemischen Behandlung mit SSS1 oder einer anderen Methyltransferase aufgemethyliert. Diese Methylierung führt dazu, daß sämtliche Cytosinbasen in der DNA-Probe in 5-Methylcytosin umgewandelt werden und damit bei der chemischen Behandlung keine Umwandlung in Thymin mehr erfolgen kann. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden beide DNA-Proben nach den beschriebenen Vorbehandlungsschritten amplifiziert, wiederum bevorzugt wird dies mittels PCR durchgeführt.

In einem dritten Schritt des Verfahrens werden die beiden behandelten DNA-Proben mittels der gleichen analytischen Methode auf die Präsenz von Cytosin untersucht. Die ermittelten Cytosin Positionen werden mit denen einer Referenz DNA-Sequenz abgeglichen. Diese Referenz DNA Sequenz kann prinzipiell beliebig gewählt werden, kann jedoch mit der untersuchten Probe nicht identisch sein. Bevorzugt stammt die Referenzsequenz aus einer Datenbank, wie sie derzeit beispielsweise im Rahmen des Humangenomprojektes entstehen oder bereits vorhanden sind. Der Abgleich mit der Referenz-DNA kann nun je nach detektierten Cytosinbasen für eine gegebene Position in der Probe zu den folgenden Ergebnissen führen: Wird sowohl in der aufgemethylierten Probe als auch in der nicht aufgemethylierten Probe ein Cytosin nachgewiesen, so liegt dieses Cytosin in der genomischen DNA methyliert vor. Wird nur in der aufgemethylierten Probe ein Cytosin nachgewiesen und in der nicht aufgemethylierten Probe ein Thymin, so liegt in der genomischen DNA ein nicht methyliertes Cytosin vor. Wird dagegen in beiden Proben ein Thymin nachgewiesen und ist aber in der Referenz-Sequenz an gleicher Position ein Cytosin vorhanden, so liegt eine C-T Punktmutation oder ein "Single Nucleotide Polymorphism" (SNP) vor.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Amplifikation im zweiten Schritt so durchgeführt, daß in einem Amplifikationsansatz mehr als 10 unterschiedliche Fragmente erzeugt werden. Dies kann bevorzugt durch Verwendung von Primern erfolgen, welche für die Genregulation wichtige sogenannte Konsensus-Sequenzen oder solche Sequenzen enthalten und die damit überwiegend an regulative oder kodierende Sequenzen binden. Bei dieser Amplifikation werden die Produkte bevorzugt durch Einbau von mit einer detektierbaren Markierung versehenen Nukleotidbausteinen oder Oligonukleotiden (z. B. Primer) insgesamt mit einer oder mehreren detektierbaren Markierung(en) versehen, wobei eine Detektion der Markierung besonders bevorzugt durch Fluoreszenz oder Chemolumineszenz erfolgt.

Die Untersuchung der Cytosin Positionen erfolgt in einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens derart, daß Cytosin ausschließlich im spezifischen Kontext 5'-CpG-3' detektiert wird. Dies kann bevorzugt durch einen Nachweis des Cytosins über Hybridisierung mit für "Sequenzkontext-Cytosin-Sequenzkontext" spezifischen Oligomeren durchgeführt werden, welche in einer definierten Anordnung auf einer oder mehreren Oberflächen fixiert sind. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens ist für jedes in seinem sequenzspezifischen Kontext nachzuweisende Cytosin mindestens ein zu dem Sequenzkontext komplementäres Oligomer auf der Oberfläche fixiert, welches das zum nachzuweisenden Cytosin komplementäre Guanin enthält und ein weiteres Oligomer, welches an der Stelle des nachzuweisenden Cytosins die Base enthält, welche zu der Base komplementär ist, in welche nicht methylierte Cytosine durch die chemische Behandlung umgewandelt werden. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens handelt es sich hier, falls eine Bisulfit-Behandlung durchgeführt wird, um die dem Thymin komplementäre Base Adenin.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden für nachzuweisende Cytosin-Positionen solche Oligomere an der oder den Oberfläche(n) fixiert, die jeweils an die methylierte und unmethylierte Cytosin-Position sowohl auf den Plus- als auch auf dem Minus-Strang spezifisch binden oder/und an die jeweils durch Amplifikation entstehenden komplementären Stränge spezifisch hybridisieren.

In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden auf der oder den Oberfläche(n) weitere Oligomere fixiert, welche jeweils an die Sequenz "Sequenzkontext-Thymin-Sequenzkontext" spezifisch binden und/oder welche Cytosin und die durch chemische Behandlung entstandene Base im Plus-Strang, Minus-Strang und den je durch Amplifikation entstehenden komplementären Strängen entstehenden Strängen nachweisen.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden an den Punkten der Oberfläche(n), an denen die Oligomere fixiert sind, Signale detektiert, die für die in der originalen genomischen Probe methylierten, oder unmethylierten oder mutierten spezifisch sind. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens sind die detektierten Signale quantifizierbar, so daß der absolute Grad der Methylierung und/oder die Homo- bzw. Heterozygotie ermittelbar sind.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden die amplifizierten Fragmente der beiden Proben, aufgemethyliert und nicht aufgemethyliert, auf je einer Oberfläche fixiert und mit einer nachweisbaren Markierung versehene, sequenzspezifische Oligomere auf diesen Oberflächen an die beiden Proben hybridisiert. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die hybridisierten sequenzspezifischen Oligomere mittels Massenspektrometrie und bevorzugt einem MALDI Massenspektrometer nachgewiesen. In einer weiteren, besonders bevorzugten Va-

riante des Verfahrens erfolgt die Analyse der hybridisierten sequenzspezifischen Oligomere mittels deren Fluoreszenz oder Chemolumineszenz.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens wird der Nachweis von Cytosin im Sequenzkontext durch eine Polymerase-Reaktion, welche spezifisch bei Erreichen einer Cytosin-Base im Templat gestoppt wird, und Längenmessung der entstehenden Fragmente durchgeführt. Dabei können die Oligomere, die zum Starten der primerabhängigen Polymerase-Reaktion benutzt werden, bevorzugt je unterschiedliche Sequenz an unterschiedlichen Orten auf einer Oberfläche fixiert sein und die Polymerase-Reaktion kann bevorzugt auf dieser Oberfläche erfolgen. In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens können die Oligomere, die zum Starten der primerabhängigen Polymerase-Reaktion benutzt werden, durch eine chemische Reaktion oder durch Licht von der Oberfläche abgelöst werden. Zur Termination der Polymerasereaktion an der Position eines Cytosins oder – im Gegenstrang – eines Guanins wird bevorzugt ein Nukleotidbaustein verwendet, welcher über eine chemische Modifikation auch eine Detektion zum Beispiel durch Fluoreszenz, Chemolumineszenz oder das Binden eines Antikörpers erlaubt. Auch kann die Detektion der Termination an der Position eines Cytosins oder – im Gegenstrang – eines Guanins über eine Längenmessung der entstehenden Fragmente durch Gelelektrophorese, insbesondere Kapillarelektrophorese erfolgen. In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt die Längenmessung der entstehenden Fragmente durch massenspektrometrische Analyse und bevorzugt in einem MALDI Massenspektrometer.

Zur Durchführung des Verfahrens kann ein Kit verwendet werden, der Referenz-DNA und/oder Chemikalien und Hilfsmittel zur Durchführung der Bisulfit-Reaktion und/oder der Amplifikation und/oder eine Methyltransferase und/oder Dokumentation zur Durchführung des Verfahrens enthält.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird an Hand der beigefügten Abbildung erläutert.

In Fig. 1 sind Punktmutationen von Cytosin zu Thymin als Thymin sowohl in der Bisulfit-behandelten und amplifizierten als auch in der zuvor methylierten, Bisulfit-behandelten und amplifizierten DNA nachweisbar. Methylierte Cytosine werden in beiden Fällen als Cytosin nachgewiesen, dagegen werden unmethylierte Cytosine nur in der nicht methylierten Probe als T und in der methylierten Probe als C nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Unterscheidung von 5-Position Methylierungsänderungen von Cytosin-Basen und Cytosin-zu-Thymin Mutationen und zum Nachweis von single nucleotide polymorphisms (SNPs) oder Punktmutationen in genomischer DNA, **dadurch gekennzeichnet**, daß man

- a) eine genomische DNA-Probe mit Sulfit oder Disulfit derart behandelt, daß alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosinbasen derart verändert werden, so daß eine dem Basenpaarungsverhalten nach unterschiedliche Base entsteht, während die an der 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben und
- b) ein Aliquot der selben genomischen DNA-Probe vor der chemischen Behandlung nach a) mit SSS1 oder einer anderen Methyltransferase quantitativ aufgemethyliert und
- c) die beiden so behandelten DNA-Proben mit

tels der gleichen analytischen Methode auf die Präsenz von Cytosin untersucht und

d) die ermittelten Cytosin Positionen mit einer Referenz DNA-Sequenz abgeglichen werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man über den Vergleich der einzelnen Cytosin-Positionen aus den beiden unterschiedlich behandelten Proben mit der Referenz-Sequenz ermittelt, ob an einer bestimmten Position Cytosin nicht nachweisbar ist und ob dies darauf beruht, daß das Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorliegt oder durch eine Mutation oder einen Polymorphismus verändert vorliegt und somit in der genomischen DNA nicht vorhanden ist. 5
3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die beiden DNA-Proben oder Teile dieser DNA-Proben vor dem Nachweis der Base Cytosin mit einem cyclischen Prozess, nämlich der Polymerase Kettenreaktion oder einem vergleichbaren Prozess amplifiziert. 10
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man in einem Amplifikations-Ansatz mehr als 10 verschiedene Fragmente der behandelten genomischen DNAs erzeugt. 15
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Amplifikation der genomischen DNA-Proben solche Primer verwendet, welche für die Genregulation wichtige sogenannte Konsensus-Sequenzen oder solche Sequenzen enthalten und die damit überwiegend an regulative oder kodierende Sequenzen binden. 20
6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Cytosin im spezifischen Kontext 5'-CpG-3' detektiert. 25
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die DNA bei der Amplifikation durch Einbau von mit einer detektierbaren Markierung versehenen Nukleotidbausteinen oder Oligonukleotiden insgesamt mit einer oder mehreren detektierbaren Markierung(en) versieht. 30
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion der Markierung durch Fluoreszenz oder Chemoluminiszenz erfolgt. 35
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Cytosin über Hybridisierung mit für "Sequenzkontext-Cytosin-Sequenzkontext" spezifischen Oligomeren nachweist, welche in einer definierten Anordnung auf einer oder mehreren Oberflächen fixiert sind. 40
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man für jedes in seinem sequenzspezifischen Kontext nachzuweisende Cytosin mindestens ein zu dem Sequenzkontext komplementäres Oligomer auf der Oberfläche fixiert, welches das zum nachzuweisenden Cytosin komplementäre Guanin enthält und ein weiteres Oligomer, welches an der Stelle des nachzuweisenden Cytosins die Base enthält, welche zu der Base komplementär ist, in welche nicht methylierte Cytosine durch die chemische Behandlung umgewandelt werden. 45
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man für nachzuweisende Cytosin-Positionen solche Oligomere fixiert, die jeweils an die methylierte und unmethylierte Position sowohl auf Plus- als auch auf Minus-Strang spezifisch binden oder/und an die je durch Amplifikation entstehenden komplementären Stränge spezifisch hybridisieren. 50
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, da-

durch gekennzeichnet, daß man auf der Oberfläche weitere Oligomere fixiert, welche jeweils an die Sequenz "Sequenzkontext-Thymin-Sequenzkontext" spezifisch binden und/oder welche Cytosin und die durch chemische Behandlung entstandene Base im Plus-Strang, Minus-Strang und den je durch Amplifikation entstehenden komplementären Strängen entstehenden Strängen nachweisen.

13. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man von den Oligomeren an Punkten der Oberfläche(n) Signale detektiert, die für die in der originalen genomischen Probe methylierten, oder unmethylierten oder mutierten spezifisch sind.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man durch den Vergleich der detektierten Signale der absolute Grad der Methylierung und/oder die Homo- bzw. Heterozygotie ermittelt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die amplifizierten Fragmente der beiden Proben auf je einer Oberfläche fixiert und mit einer nachweisbaren Markierung versehene, sequenzspezifische Oligomere auf diese Oberflächen hybridisiert.

16. Verfahren nach Anspruch 15, daß man die Analyse der hybridisierten sequenzspezifischen Oligomere mittels Massenspektrometrie und bevorzugt einem MALDI Massenspektrometer durchführt.

17. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man die Analyse der hybridisierten sequenzspezifischen Oligomere mittels Fluoreszenz oder Chemoluminiszenz durchführt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis von Cytosin im Sequenzkontext durch eine Polymerase-Reaktion, welche spezifisch bei Erreichen einer Cytosin-Base im Templat gestoppt wird, und Längenmessung der entstehenden Fragmente erfolgt.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oligomere, die zum Starten der primerabhängigen Polymerase-Reaktion benutzt werden, je unterschiedliche Sequenz an unterschiedlichen Orten auf einer Oberfläche fixiert und die Polymerase-Reaktion auf dieser Oberfläche erfolgt.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oligomere, die zum Starten der primer-abhängigen Polymerase-Reaktion benutzt werden, durch eine chemische Reaktion oder durch Licht von der Oberfläche ablöst.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Termination der Polymerasereaktion an der Position eines Cytosins oder – im Gegenstrang – eines Guanins einen Nukleotidbaustein verwendet, welcher über eine chemische Modifikation auch eine Detektion zum Beispiel durch Fluoreszenz, Chemoluminiszenz oder das Binden eines Antikörpers erlaubt.

22. Verfahren nach Anspruch 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man die Detektion der Termination an der Position eines Cytosins oder – im Gegenstrang – eines Guanins über eine Längenmessung der entstehenden Fragmente durch Gelelektrophorese, insbesondere Kapillarelektrophorese durchführt.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man die Längenmessung der entstehenden Fragmente durch massenspektrometrische Analyse und bevorzugt in einem MALDI Massenspektrometer durchführt.

24. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprü-

che, dadurch gekennzeichnet, daß die Referenz DNA-Sequenz aus einer Datenbank, nämlich aus dem Humangenom-Projekt, stammt.

25. Kit, enthaltend Referenz-DNA und/oder Chemikalien und Hilfsmittel zur Durchführung der Bisulfit-Reaktion und/oder der Amplifikation und/oder eine Methyltransferase und/oder Dokumentation zur Durchführung des Verfahrens.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

